

#2

1c971 U.S. PTO

10/029606



(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this Office.

Date of Application: December 22, 2000

Application Number: Japanese Patent Application
No. 391365/2000

Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

October 26, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3093451

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

JC971 U.S. PRO
10/029606
12/20/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-391365

出 願 人

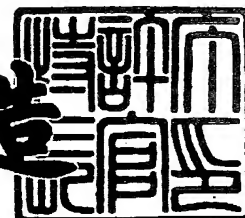
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3093451

【書類名】 特許願

【整理番号】 12B011

【提出日】 平成12年12月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 ビーズ

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 中尾 素直

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 山本 顕次

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 伊藤 敏明

【特許出願人】

 【識別番号】 000233055

 【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110191

 【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 和男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビーズ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 相互の間隔が最短である所定の方向の直線状に配列されている複数の位置に対して、平行して隣接する直線状に配列されている複数の位置がそれら直線方向において互いにずれている 2 次元上の複数の位置に応じた特徴量を各ビーズが有する複数のビーズの組から成ることを特徴とするビーズ。

【請求項 2】 3 次元以上の複数の位置に応じた特徴量を各ビーズが有する複数のビーズの組からなることを特徴とする請求項 1 記載のビーズ。

【請求項 3】 前記複数の各位置が最密構造の位置であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のビーズ。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基変異多型) の検出のためのプローブなどの標識として用いることができるビーズに関し、特に、例えば少ない色の種類で数多くに分離することができるビーズに関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

図 3 は、分離用に使用するビーズを示す図である。透明又は半透明のビーズ 2 に # 1 蛍光物質 1 及び # 2 蛍光物質 1 を封入しておいて、蛍光の励起光を照射すると、# 1 蛍光物質 1 に特有の蛍光 FL 2 及び # 2 蛍光物質 1 に特有の蛍光 FL 3 をそれぞれ発光する。そこで、# 1 蛍光物質 1 及び # 2 蛍光物質 1 を入れる量をそれぞれ適当に変えることによって発光する蛍光の明るさがそれぞれ変わるので、その発光する蛍光の強度をそれぞれ検出することによって、# 1 蛍光物質 1 及び # 2 蛍光物質 1 がそれぞれどれ位の量だけ入っていたかを検出することができ、これによりビーズを分離することができる。したがって、SNP の検出のためのプローブの標識としてこのビーズを用いることで、プローブを識別することができる。なお、さらに定量用の蛍光物質を標識しておいて、その蛍光物質が発

光する光量を検出することによって分離されたビーズの量を定量的に測定するようにしてもよい。

【0003】

このようなビーズの分離技術によって、例えば、ビーズの中に入れる2種類の蛍光物質の濃度をそれぞれ10段階に切り分けることによって、計100 ($= 10 \times 10$) 種類のビーズを色分けすることができる。

理論的には、濃度の間隔を細かくすることによって、10段階に切り分けを行っているところを増やすことも可能ではあるが、実際に蛍光を測定する際には測定誤差等も発生するため、確実に切り分けるためには、濃度間隔に一定のしきい値を設ける必要がある。

【0004】

また、使用している蛍光物質の種類を増やすことにより3次元、4次元とすれば、3次元で1000 ($= 10^3$) 種類、4次元では10000 ($= 10^4$) 種類のビーズの色分けを行うことが可能となる。

ビーズの作成には、通常透明度の高いポリスチレンなどを使用する。

用いるビーズの大きさは、識別する対象に応じて、ナノメートルオーダーから、マイクロメートルオーダー、ミリメートルオーダー、センチメートルオーダーなど任意である。

【0005】

分離装置としては例えば、フローサイトメーターを使用する。フローサイトメーターは本来は細胞の状態を調べるための装置として開発されたものであり、細胞の形状及びに表面を蛍光で標識することにより、赤血球や白血球の状態を調べるための分析機械である。細胞粒子を一つ一つ流すためのノズルと細胞を測定するためのレーザー光源と検出部としてフォトダイオードやPMT（光電子増倍管）などを兼ね備えている。

【0006】

図4は、従来の2次元に色分離する色配置の例を示す図である。横軸にオレンジの蛍光物質濃度、すなわち、蛍光強度をとり、縦軸に赤の蛍光物質濃度、すなわち、蛍光強度をとると、それぞれ10段階に切り分けることによって、計10

0 ($= 10 \times 10$) 種類のビーズを色分けすることができる。したがって、例えば #1 ~ #3 ビーズ 2 として、その 100 の中の 1 つの蛍光物質濃度の組を選択することにより、各ビーズを色分離することができる。

【0007】

図 5 は、測定誤差を説明する図である。ビーズに入っている蛍光物質が発光する蛍光を実際に計測すると、まったく同じ濃度の蛍光物質を含んだビーズであっても、その蛍光強度にはある程度の広がりを持った分布がでてくる。これは実際に測定する際には、入れる蛍光物質の量、その蛍光物質が発光する光量、及び、発光した光量を測定する測定器などで誤差がでるためである。ビーズの分離はこれらの誤差を考慮したうえで行う必要がある。これらの誤差は通常は本来の濃度である一点を中心に正規分布にそった形で分布するために、となりの濃度のポイントはこれら分布の誤差範囲を考えて、一定の間隔をあける必要がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

例えば、SNP の検出などで使用するためには、分離を行うためのビーズの種類を逐次増やす必要がある。このため、より少ない種類の色でより多くのビーズを分離する技術が求められている。

本発明は、上記問題点に鑑み、より少ない切り分け段階の特徴量でより多くのビーズを分離することができるビーズを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明のビーズは、相互の間隔が最短である所定の方法の直線状に配列されている複数の位置に対して、平行して隣接する直線状に配列されている複数の位置がそれら直線方向において互いにずれている 2 次元上の複数の位置に応じた特徴量を各ビーズが有する複数のビーズの組から成る。

また、3 次元以上の複数の位置に応じた特徴量を各ビーズが有する複数のビーズの組からなることで、一層分離可能解像度を増やすことができる。

また、前記複数の各位置が最密構造の位置であることで、理想的な分離解像度を実現することができる。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。

図 1 は、本発明の一実施の形態によるビーズの平面色配置を示す図である。図 1 (a) の従来例に対して図 1 (b) に本発明の色配置を示している。特徴量の 1 つの例として色を用いて、横軸に蛍光 F L 2 の発光強度をとり、縦軸に蛍光 F L 3 の発光強度をとって、黒く示される各ポイントは色分離するための各ビーズを示しており、その位置における蛍光 F L 2 及び蛍光 F L 3 を発光する濃度の蛍光物質が入れられているビーズを示している。図 1 (a) の従来例では、蛍光 F L 2 方向の直線状に配列されている位置に対して蛍光 F L 3 方向に、すべて同じ位置にポイントをおいている。すなわち、各ポイントは基盤の目の位置に存在している。これにより各ポイントの間隔の最短距離が「1」となるようにしている。これに対して図 1 (b) の本発明では、蛍光 F L 2 方向の直線状に配列されている位置に対して、平行に隣接する直線状に配列されている位置が蛍光 F L 2 方向においてずれている 2 次元上の複数の位置にポイントをおいている。図示例の場合は特に、各ポイントは平面上の最密構造の位置に存在している。これによりやはり各ポイントの間隔の最短距離が「1」となるようにしている。

【 0 0 1 1 】

このため、同じように各ポイントの間隔の最短距離が「1」となるようにしつつ、2次元目（F L 3 方向）の濃度間隔を従来に比べて $(\sqrt{3})/2$ （ ≈ 0.866 ）で行うことが可能となる。すなわち、分離可能解像度を約 15%（ $\approx 1/0.866 - 1$ ）増やすことが可能になる。

実際にビーズを分離する際には、ビーズから発光している蛍光 F L 2 及び蛍光 F L 3 の各量から、その周囲のポイントの位置までの距離を計算して最短距離にあるポイントのビーズであると分離することになる。

【 0 0 1 2 】

本発明ではたとえば、F I T C（イソチオシアン酸フルオレセイン）と P E（フィコエリスリン）で染色したビーズにアルゴンレーザーを照射すると、どちら

の蛍光物質も488nmの光で励起され、FITCは530nmの蛍光を、PEは575nmの蛍光を発する。このようにしてFITCとPEの濃度を変えてビーズを染色することにより、ビーズを識別することが可能になる。ここで使用する蛍光試薬は特に限定するわけではなく、蛍光試薬の励起波長と蛍光波長は重なり合わないよう組み合わせれば、なんでもよい。

【0013】

その他、488nmで励起する蛍光物質としては、ECD (Beckman Coulter社製：613nmの蛍光)、PC5/PE-Cy5 (Beckman Coulter社製：670nmの蛍光波長) などが存在する。

また、レーザー光源を複数搭載することにより、他の蛍光試薬にも対応することが可能となる。

また、ビーズの大きさについては通常のフローサイトメーターは細胞に最適化されているために直径は数 μ m程度が望ましい。この際にフローサイトメーターには前方錯乱光を測定することができるが、これは測定物の大きさを反映するために、この前方錯乱光を指標に目的とするビーズのみを分類することが可能となる。

【0014】

図2は、本発明の一実施の形態によるビーズの立体色配置を示す図である。図2(a)は上から見た図であり、横軸に蛍光FL2の発光強度をとり、縦軸に蛍光FL3の発光強度をとって、黒く示されるポイントは1つの平面上にあり、斜めではあるがここでは従来と同様に碁盤の目の位置に存在している。これによりやはり各ポイントの間隔の最短距離が「1」となるようにしている。これに対して、白く示されるポイントは黒く示されるポイントとは異なる平面上にあり、平面的には、すなわち、上から見た図では、黒く示されるポイントと白く示されるポイントとが異なる位置に存在している。そして、白く示されるポイントは周りの黒く示されるポイントからの距離が等しい位置に存在している。図2(b)はこれを横から見た図であり、横軸に蛍光FL2の発光強度をとり、縦軸に3番目の蛍光物質による蛍光FL4の発光強度をとっている。

【0015】

3次元においては図2のような切り分けを行うことにより、3次元目の濃度勾配は $(\sqrt{2})/2$ (≈ 0.707)で行うことが可能となり、同じ有効部分において、分離可能解像度を約41% ($\approx 1/0.707 - 1$) 増やすことが可能になる。図2は全体として立方最密構造であるが、六方最密構造であっても同様に分離可能解像度を約41%増やすことが可能になる。

なお、本発明は上記実施の形態に限定されるものではない。

【0016】

図2にも示すように、相互の間隔が最短である直線状の方向は必ずしも各特徴量、すなわち例えば、色の軸と同一の方向である必要はない。

特徴量は色に限られず、例えば発振器の周波数などであってもよく、この場合には発振器の発振強度又は発振パルスの衝撃係数などで段階分けを行うことができる。

次元は、2次元、3次元に限られず、4次元以上であってもよい。いずれにしても最密構造であることが望ましい。

各特徴量のスケールは線形のものに限られず、対数目盛りなどの非線形の日盛りであってもよい。

【0017】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、2次元の分離可能解像度において約15%、3次元の分離可能解像度において約41%、さらに4次元以上の分離可能解像度においても、勾配における切り分けを増やすことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施の形態によるビーズの平面色配置を示す図である。

【図2】

本発明の一実施の形態によるビーズの立体色配置を示す図である。

【図3】

分離用使用するビーズを示す図である。

【図4】

従来の 2 次元に色分離する色配置の例を示す図である。

【図 5】

測定誤差を説明する図である。

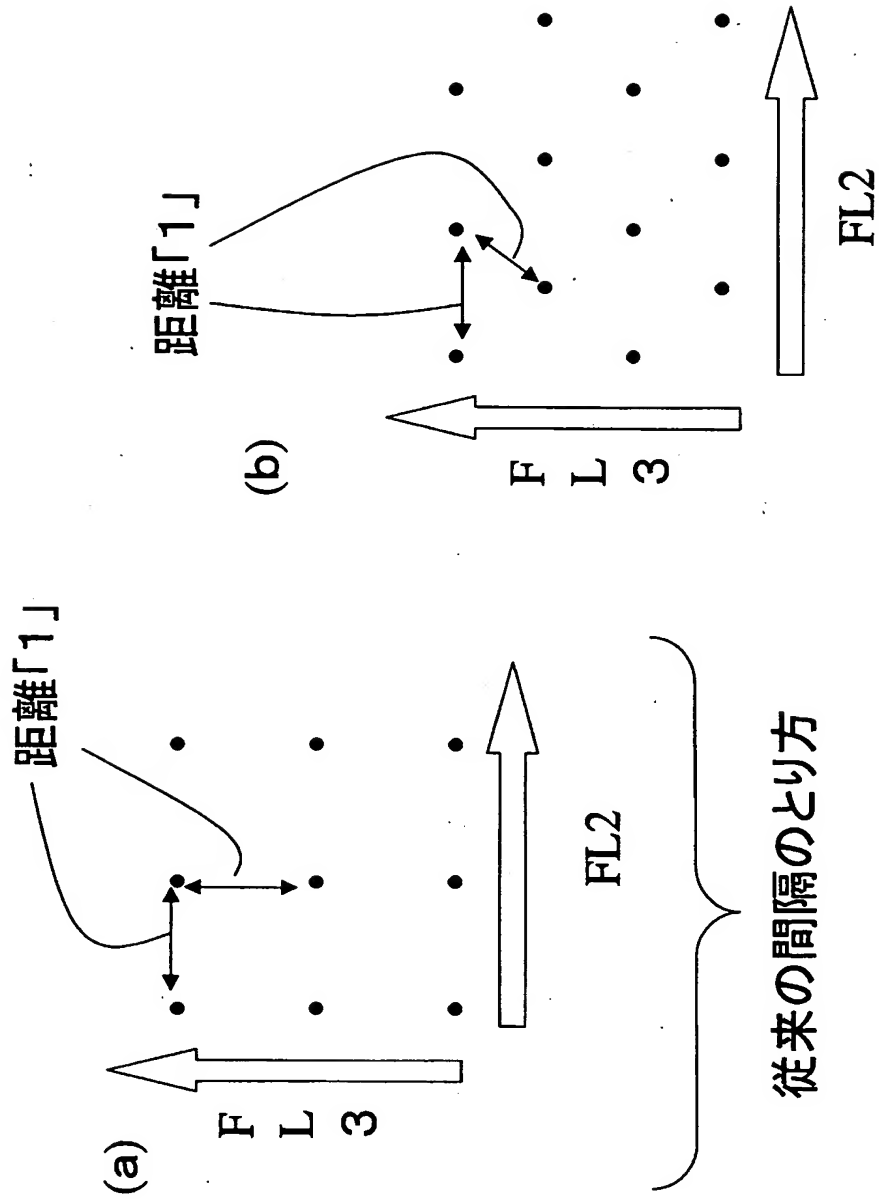
【符号の説明】

- 1 蛍光物質
- 2 ビーズ

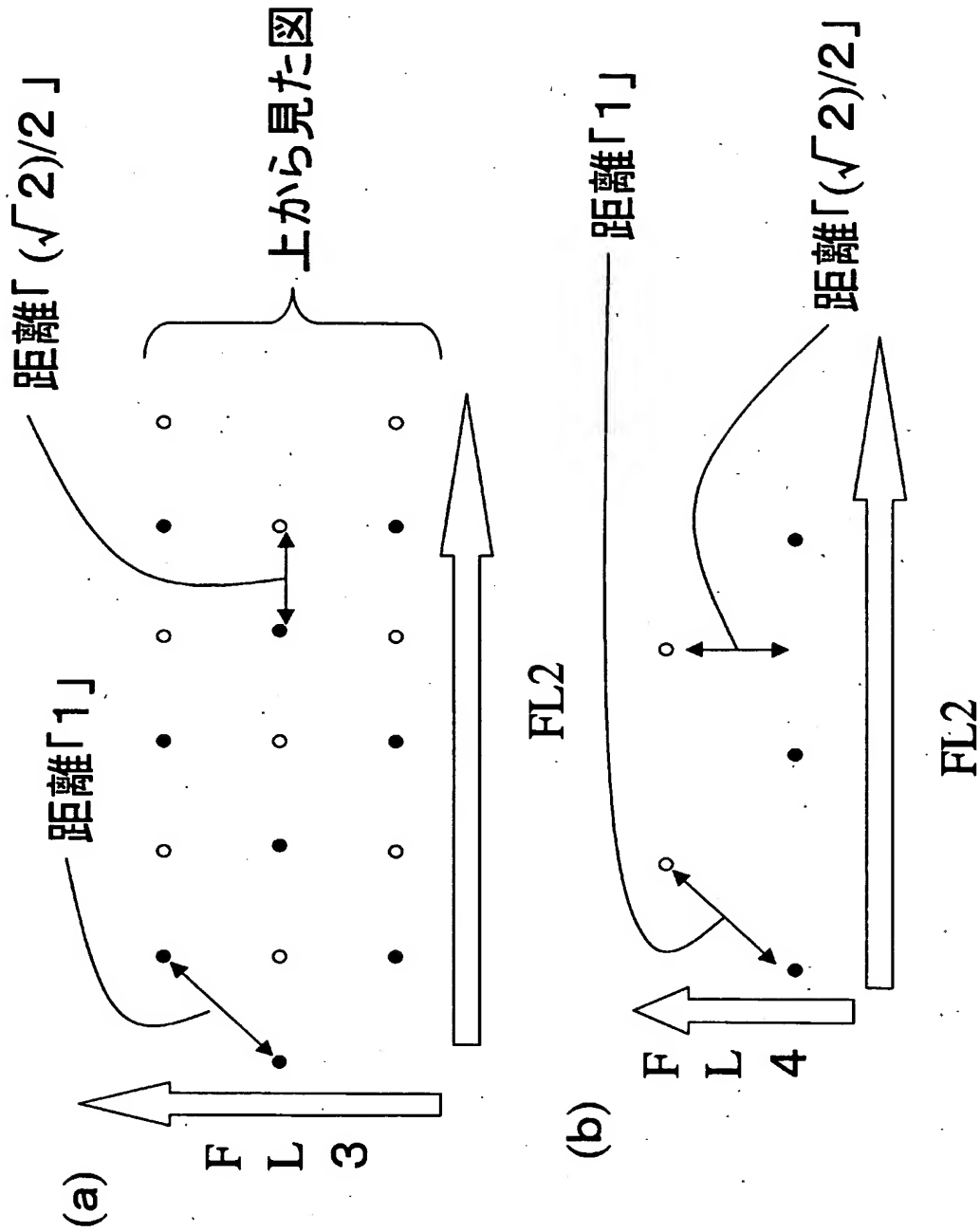
【書類名】

図面

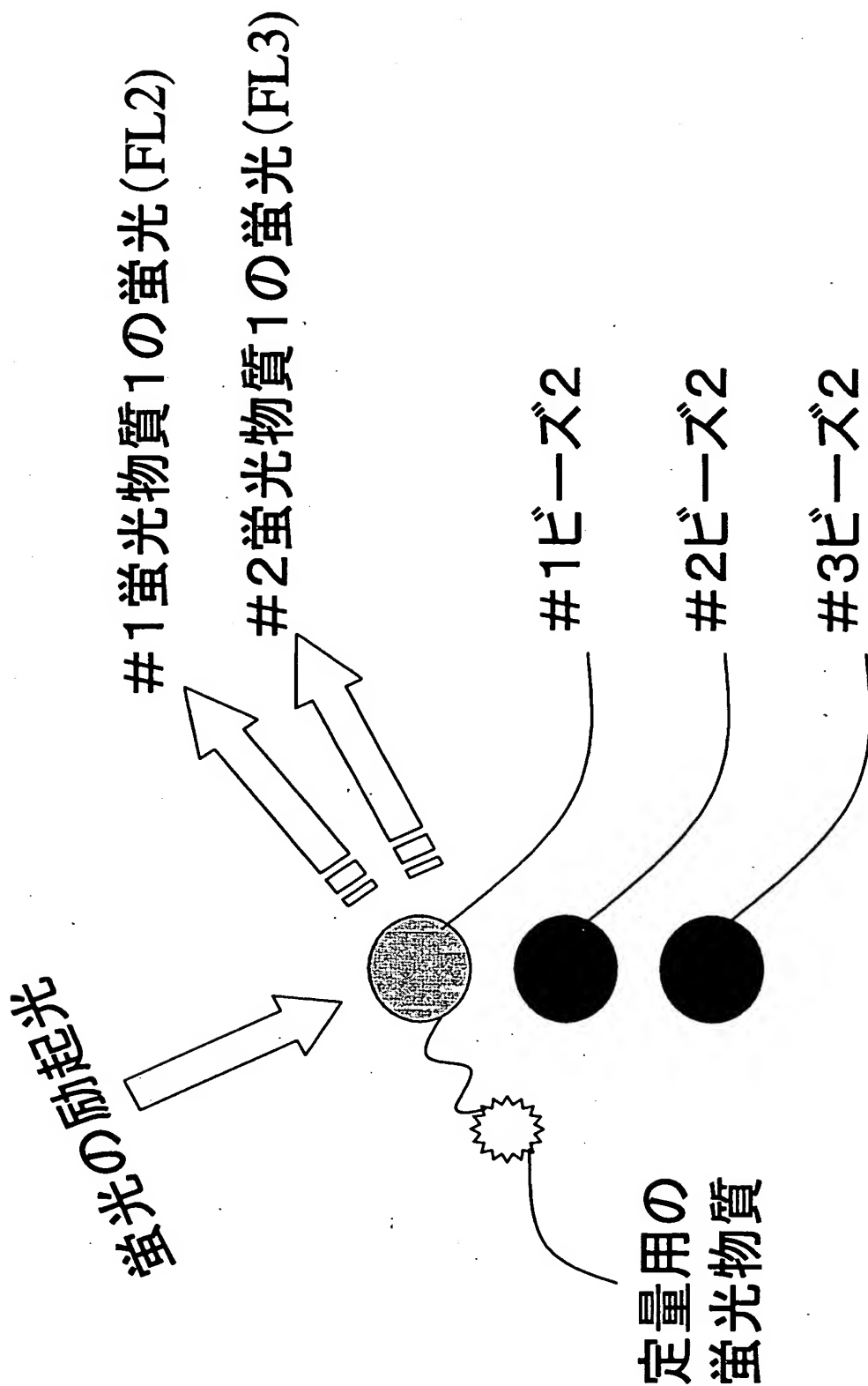
【図 1】



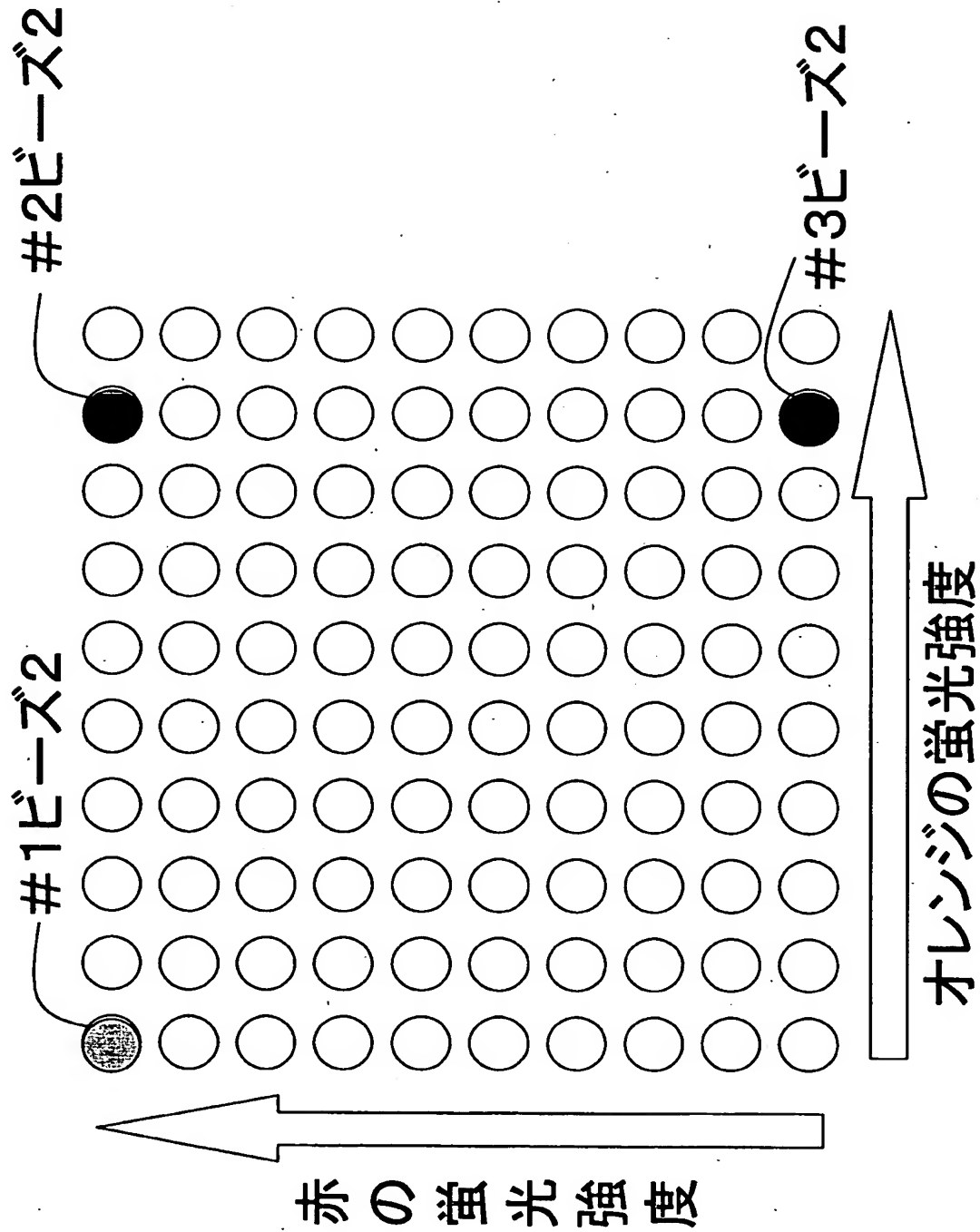
【図 2】



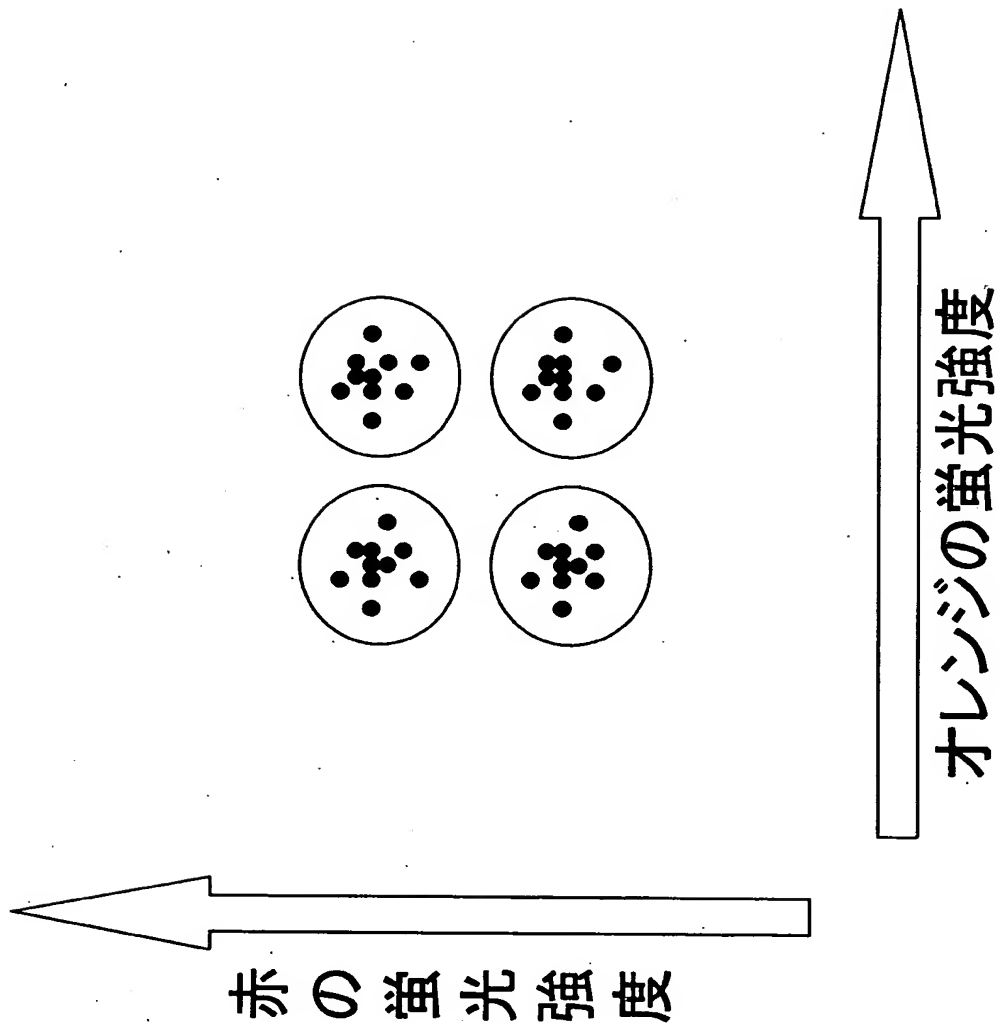
【図3】



【図4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 濃度勾配により、色分けを行う際に、2次元および3次元における勾配のとり方に創意工夫を凝らすことにより、色分けの種類の増やす。

従来の色分けの際は2次元の際はX軸、Y軸それぞれに平行な交点にポイントを取り、3次元の際はXY軸YZ軸ZX軸にそれぞれ平行な交点にポイントを取り分離を行っていた。

【解決手段】 軸上に平行な直線の交点上にポイントをとらずに、各々をずらして配置し、解析することにより従来よりも確実な分離が行え、その結果従来と同精度な解析においては、ポイント数を増やすことが可能になる。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社